

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-30667

⑬ Int.Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)2月8日

C 12 N 1/16
C 08 B 37/00
C 12 P 19/04

G 9050-4B
P 7019-4C
A 8214-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全11頁)

⑮ 発明の名称 コレステロール及び酸化コレステロールの吸着能を有する酸性多糖類を生産するキャンディダ・ケフィール及びキャンディダ・テヌス、その生産する酸性多糖類

⑯ 特 願 平1-165077

⑰ 出 願 平1(1989)6月27日

特許法第30条第1項適用 平成元年3月10日 社団法人日本畜産学会発行の「日本畜産学会第81回大会大会要旨」に発表

⑱ 発 明 者 渡 邊 乾 二 愛知県名古屋市長区鳴海町黒石2番地の154
⑲ 発 明 者 中 村 良 愛知県名古屋市長区鳴海町篠ノ風7番地の6
⑳ 出 願 人 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
㉑ 代 理 人 弁理士 宮田 広豊 外1名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

コレステロール及び酸化コレステロールの吸着能を有する酸性多糖類を生産するキャンディダ・ケフィール及びキャンディダ・テヌス、その生産する酸性多糖類

2. 特許請求の範囲

- (1) コレステロール及び酸化コレステロールの吸着能を有する酸性多糖類を生産するキャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌス。
- (2) 微工研園寄第10731である請求項(1)に記載のキャンディダ・ケフィール。
- (3) 微工研園寄第10770である請求項(1)に記載のキャンディダ・テヌス。
- (4) キャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌスを培養して得られる培養上清を有効成分とすることを特徴とするコレステロール及び酸化コレステロール吸着剤。
- (5) キャンディダ・ケフィールまたはキャンディ

ダ・テヌスを培養し、培養上清から酸性多糖類を採取することを特徴とする酸性多糖類の製造法。

- (6) キャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌスを培養し、培養上清から採取される次の構成糖を示す酸性多糖類。

(i) キャンディダ・ケフィールの構成糖

ガラクトースとウロン酸から成る酸性多糖類

(ii) キャンディダ・テヌスの構成糖

ガラクトース、グルコース、ウロン酸から成る酸性多糖類

- (7) キャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌスが生産する酸性多糖類を有効成分とすることを特徴とするコレステロール及び酸化コレステロール吸着剤。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、コレステロール及び酸化コレステロールの吸着能を有する酸性多糖類を生産するキ

ンディダ・ケフィール及びキャンディダ・テヌス、その生産する酸性多糖類及びその製造法並びにこの培養上清、酸性多糖類等を有効成分とするコレステロール及び酸化コレステロール吸着剤に関する。

本発明の吸着剤は、食品中に存在するコレステロールあるいは変異原物質である酸化コレステロールといった生体有害物質を吸着する作用を有するので、これらを食品中から除去したり、消化管内から体外への排出を促進する目的で飲食品に添加することのできる機能性食品素材として利用することができる。また食品や生体試薬等からこれらの物質を分別、分画し、定性、定量する目的の試薬としても利用することができる。

従来の技術及び解決しようとする課題

本発明者等は、ロドコッカス属(*Rhodococcus* sp.)やバシルス属(*Bacillus* sp.)の微生物が、水溶性多糖類を生産し、これが水不溶性のコレステロールを吸着して水溶性とすることを報告してき

た。しかし、乳用酵母がこのような性質を有する水溶性多糖類を生産するという報告はなされていない。本発明者等は、多数の乳用酵母について有用な性質をもつ水溶性多糖類の生産能についての検討を行ったものである。

課題を解決するための手段

本発明者は、多数の乳関連ストックカルチャーの酵母あるいは乳製品より分離した酵母について、コレステロール添加培地での培養過程において、コレステロール吸着性成分を生産する酵母の検索を行った。その結果、アルコール性発酵乳飲料のシードカルチャーとして用いられるケフィール粒から分離されたキャンディダ・テヌス(*Candida tenuis*)及びキャンディダ・ケフィール(*Candida kefyr*)がこのような活性のある株であることを見出し、活性成分の精製と諸性質の解析を行って本発明を完成するに至った。さらに、本発明では、変異原物質である酸化コレステロールも吸着することにより、本活性成分が脱変異原作用を有するか否か

についてもあわせて検討を行った。

すなわち、本発明は、

- (1) コレステロール及び酸化コレステロールの吸着能を有する酸性多糖類を生産するキャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌス。
- (2) 微工研菌寄第10731である請求項(1)に記載のキャンディダ・ケフィール。
- (3) 微工研菌寄第10770である請求項(1)に記載のキャンディダ・テヌス。
- (4) キャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌスを培養して得られる培養上清を有効成分とすることを特徴とするコレステロール及び酸化コレステロール吸着剤。
- (5) キャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌスを培養し、培養上清から酸性多糖類を採取することを特徴とする酸性多糖類の製造法。
- (6) キャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌスを培養し、培養上清から採取される

次の構成糖を示す酸性多糖類。

(i) キャンディダ・ケフィールの構成糖

ガラクトースとウロン酸から成る酸性多糖類

(ii) キャンディダ・テヌスの構成糖

ガラクトース、グルコース、ウロン酸から成る酸性多糖類

- (7) キャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌスが生産する酸性多糖類を有効成分とすることを特徴とするコレステロール及び酸化コレステロール吸着剤

に関する。

本発明におけるケフィール粒から分離されたキャンディダ・テヌス SBT 5287 (*Candida tenuis*)は次のような菌学的性質を有する。

形状・大きさ	長卵円形 2~4×5~10 μ
増殖形式	出芽
子嚢胞子	-
偽菌糸	+

イーストエキス・グルコース 生育 旺盛
ペプトン培地 (25℃) リング 沈殿 細顆粒状

ポテトデキストロース 生育 旺盛
寒天培地 (25℃) 色 クリーム スムース

アルブチン分解性 +

硝酸塩還元性 -

カロチノイド色素生産性 -

糖発酵性 グルコース +

ガラクトース ±

シュクロース -

マルトース -

ラクトース -

糖質化性 ガラクトース ±

シュクロース +

マルトース +

セロビオース +

ラクトース -

メリビオース -

ラフィノース -

澱粉様物質生産性 -

硝酸塩還元性 -

糖発酵性 グルコース +

ガラクトース +

シュクロース +

マルトース -

ラクトース +

ラフィノース +

トレハロース -

メリビオース -

イヌリン +

糖質化性 ガラクトース +

ラフィノース ±

シュクロース +

マルトース -

キシロース -

セロビオース -

アラビノース -

トレハロース -

メレチトース +

キシロース +

アラビノース ±

リボース +

ラムノース +

また、同様にケフィール粒から分離されたキャンディダ・ケフィール SBT 5286 (*Candida kefyr*) は次のような菌学的性質を有する。

形状・大きさ 長卵円形 3~8×5~13μ

増殖形式 出芽

子嚢胞子 グロドコワ培地 -

マッククラーク培地 -

人參培地 -

馬鈴薯培地 -

イーストエキス・麦芽エキス 生育 旺盛
培地 (25℃) 皮膚・リング -

沈殿 細顆粒状

ポテトデキストロース 生育 旺盛
寒天培地 (25℃) 色 クリーム 色

カロチノイド色素生産性 スムース -

リボース -

ラクトース +

本発明者等は、これらの性質をもとに、「The yeasts — a taxonomic study」(N.J.W.Kreger-van Rij 編 1984)に従って検討した結果、前者をキャンディダ・テヌス(*Candida tenuis*)、後者をキャンディダ・ケフィール(*Candida kefyr*)と同定した。しかし、通常のキャンディダ・テヌス、キャンディダ・ケフィールは、コレステロール及び酸化コレステロールの吸着能を有する酸性多糖類を産生しないのに対し、本発明のものは酸性多糖類を産生し、この性質は継代培養によって変化しないことから本発明のキャンディダ・テヌス、キャンディダ・ケフィールは通常のキャンディダ・テヌス、キャンディダ・ケフィールの変異株と考えられる。

本発明者等は、上記した性質を有する菌株を、他の公知の株と区別するため、工業技術院微生物工業技術研究所に前者は受託番号微工研菌寄第

10770 (FERM p-10770) 後者は受託番号微工研菌寄第10731 (FERM p-10731) として寄託した。

本発明では、これらの菌株の自然変異株、あるいは紫外線照射、コバルト60照射、化学変異誘導剤処理等の人工的変異処理で変異させた人工変異株であってもそれがコレステロール及び酸化コレステロールの吸着能を有する酸性多糖類を生産する限り、利用可能である。

本発明では、これらの酵母がコレステロール吸着活性を示すか否かについて次の実験を行って検討した。

すなわち、ラクトース4.0%、ポリペプトン1.0%、酵母エキス0.5%、 KH_2PO_4 0.5%及び $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%よりなり pH 6.0 に調整した液体培地に、コレステロールを0.1%添加し、10mlずつ試験管に分注、キャンディグ・テヌスまたはキャンディグ・ケフィールの菌株を前培養から3白金耳づつ接種し、37℃で振盪培養を行い、菌体当りのコレ

ステロール吸着量、培養上清におけるコレステロール吸着量及び培養上清中の糖含量を測定した。

この結果、培養後4日間は菌体に吸着されるコレステロールが増加し、その後減少するが、培養上清におけるコレステロール吸着量は4日目から増加する。一方、培養液中の糖含量は培養後一度減少するが4日目前後から次第に増加してくる。

このような変化から、培地成分としての糖類がまず消費され、その後、コレステロール吸着能を有する酸性多糖類が産生されてくることによってコレステロールが吸着され、結果的に培養上清のコレステロール吸着量が増大するものと思われた。

そこで本発明では、キャンディグ・ケフィールまたはキャンディグ・テヌスの培養上清について、実施例1の方法によってこの事実を確認した。この事実は、第1表に示されるようにキャンディグ・テヌス、キャンディグ・ケフィールに特異的にみられ、その他の酵母ではほとんどみられなかった。また、コレステロールの加熱酸化生成物であ

第 1 表

コレステロールを吸着する多糖類を生産する酵母

菌 株	コレステロール吸着量 (mg/tube)*
キャンディグ・テヌス (<i>Candida tenuis</i>) SBT 5287	4.19
キャンディグ・テヌス (<i>Candida tenuis</i>) IPO 0716	0.17
キャンディグ・リポリティカ (<i>Candida lipolytica</i>) IPO 0717	0.16
キャンディグ・リポリティカ (<i>Candida lipolytica</i>) IPO 0746	0.09
キャンディグ・リポリティカ (<i>Candida lipolytica</i>) IPO 0707	0.06
キャンディグ・ケフィール (<i>Candida kefyr</i>) SBT 5286	3.00

注) * コレステロール 10mg/tube

るコレスタン-3 β ,5 α ,6 β -トリオール(以下CTという)、25-ヒドロキシコレステロール(以下HCという)についても同様の事実を確認した。

そして、本発明では、実施例2の方法によってキャンディグ・テヌス培養上清からDEAE-セファロースクロマトグラフィによって酸性多糖類を単離し、その物性値及びコレステロール、酸化コレステロール吸着能を検討した。

また、実施例3の方法によってキャンディグ・ケフィールの培養上清についてコレステロールを吸着する酸性多糖区分を分離した。以下に本発明の実施例を示し、本発明を詳細に説明する。

実施例 1

(1) 培養上清の調製；

キャンディダ・ケフィール SBT 5286 または
 キャンディダ・テヌス SBT 5287 を、ラクトース4.0%、
 ポリペプトン1.0%、酵母エキス0.5%、 KH_2PO_4
 0.5%及び $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%よりなり、pH 6.0に
 調整された培地に接種し、37℃で4日間振盪培養
 し、培養液を6000rpmで30分間遠心分離して菌体
 を遊離し、培養上清を得た。

(2) 培養上清のコレステロール及び酸化コレステ
 ール吸着能；

この培養上清にエタノールを66%濃度まで添加
 し、生じた沈澱を7000rpmで12分間遠心分離する
 ことによって除去した後、その上清を中型試験管
 に0、1、3、5mlずつ分取し、全体量を50mMリ
 ン酸緩衝液(pH 7.0)で5mlとした。これにコレス
 テロールを5mgずつ添加、37℃で一晩振盪し、振
 盪後吸着されていない不溶性コレステロールを遠
 心して得られる濾液を、凍結乾燥し溶液中に移行

してくるコレステロール量をビアソン等の方法に
 よって測定した。この結果を第1図に示す。この
 結果、培養上清10ml当たり3~4mgのコレステロー
 ルを吸着することが明らかとなった。

また、変異原物質であるCT、HCに対する脱
 変異原作用については、サルモネラ・チヒムリウ
 ム (*Salmonella typhimurium*) TA98 株(以下TA
 98株という)を用いた Ames 法によってその効果
 を判定した。常法の Ames法を行うに当たり、TA98
 株生育培地中に上記培養上清を1~5ml添加した
 時のコロニー出現率を対照と比較した結果を第2
 図に示す。この結果、培養上清を1ml以上添加す
 ることにより、TA98株のコロニー出現率はHCで
 50%前後、CTで25%前後まで低下し、明らかに
 培養上清に脱変異原作用のあることが認められた。

また、このような上清のコレステロール吸着活
 性は、pH 4~10の範囲で比較的安定していること
 を確認した。

実施例 2

(1) 酸性多糖類の調製；

キャンディダ・テヌスから得られた実施例 1 の
 上清に、エタノールを70%濃度まで添加し、生ず
 る沈澱を7000rpm、12分間遠心分離して分取した。
 この沈澱成分を酢酸緩衝液(pH 6.0)に溶解し、D
 EAE-セファローズCL-6Bクロマトグラ
 フィにかけた。0.5-1.0M NaCl水溶液で溶出して
 得られる溶出液を透析し、凍結乾燥することによ
 り粗酸性多糖類を得た。さらにこの粗酸性多糖類
 をセファローズCL-4Bクロマトグラフにかけ、
 溶出物を凍結乾燥することによって精製酸性多糖
 類を得た。この粗製酸性多糖類の収率は、培養上
 清10mlあたり2.0~2.2mgであった。

また、このクロマトグラフの溶出フラクション
 を第3図に示す。

本発明をなす活性はフラクション(4)に認められ
 た。

(2) 精製酸性多糖類(フラクション(4))の物性値

(i) 吸光度

フェノール硫酸法によると通常の糖と同様に
 490nmに吸光度を示す。

(ii) 電気泳動

フラクション(4)をセルローズ・アセテート電気
 泳動にかけると第4図に示すような単一スポット
 を示す。

(iii) ^{13}C NMR

フラクション(4)の ^{13}C NMRは第5図のとおり。

フラクション(4)の酸性多糖類を加水分解してガ
 スクロマトグラフィーにかけた結果を第6図に示
 す。構成糖中の中性糖としてガラクトースとグル
 コースが認められた。また、本フラクションはセ
 チルトリメチルアンモニウムブロマイドの添加に
 よって沈澱が生じること、カルバゾール硫酸法に
 よって特異的な呈色が認められることからウロン
 酸の存在が確認された。

実施例 3

(1) 酸性多糖類区分の分離；

キャンディダ・ケフィールから得られた実施例

1の培養液を6000rpm、30分間遠心分離して菌体を除去した後、pH7.5に調整した。この培養上清を試験管に分注後、コレステロールを0.1%添加し、37℃で1夜振盪した後不溶性コレステロールを濾過し、得られた濾液をpH3.0に調整して氷中に1夜放置して沈澱を生成させた。これを6000rpmで30分間遠心分離し上清と沈澱とに分けた。上清及び沈澱のコレステロール含量を測定したところ上清中にはその乾燥重量に対して0μgであるのに対し、沈澱成分中には77μg存在し、上清にはコレステロールは全く吸着されないのに対し、沈澱成分にのみコレステロールが吸着されることが認められた。そこで、沈澱をpH7.5で水に溶解し、流水透析した後、凍結乾燥してコレステロールを吸着している酸性多糖区分を得た。

(2) Bio-gel-P-150カラムクロマトグラフィー；
10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で膨潤させたBio-gel-P-150(Bio Rad社製)をカラム(2.5×64cm)に充填し、約200mlの同緩衝液で平衡化・洗浄を

この表からみて、Fr. Aが他のフラクションに比べてコレステロール吸着活性が高い。

(3) Fr. AのBio-gel-P-150カラムクロマトグラフィー；

Fr. Aの単一物質を得るために本成分をさらに流水透析、凍結乾燥を行った後、上記(2)の方法によってBio-gel-P-150カラムクロマトグラフィーで再クロマトを行った。得られた各フラクションの糖、コレステロール、蛋白質及び280nmにおける吸光度を測定した。なお、糖及びコレステロールは、上記(2)と同じ方法で、蛋白質はLowery法によって測定した。

その結果を、第9図に示す。

第9図では、糖と蛋白質との最初のピークはほぼ重なるが、コレステロールは最初のピークにだけ検出されたので、このフラクションをFr. A'とした。

さらにFr. A'を上記方法(2)によって再度Bio-gel-P-150カラムクロマトグラフィーにかけた

行った。前記酸性多糖区分を同緩衝液に溶解し、カラムにかけ同緩衝液で溶出させた。各溶出画分の糖をフェノール硫酸法で、またコレステロールをビアソンらの方法によって定量した。その溶出パターンを第7図(脱コレステロール化前)及び第8図(脱コレステロール化後)に示す。コレステロール及び糖の含量からみた場合、各試料はFr. A、Fr. B、Fr. Cの3フラクションに分れた。さらにこれらコレステロールを吸着している状態の酸性多糖類及びコレステロールを遊離、除去した後の酸性多糖類をカラム処理し、得られた各フラクションとコレステロールを再び混合振盪させ、各Fr.に吸着させた場合のコレステロール含量を第2表に示す。

第2表

	単位 μg/mg (乾物)		
	Fr. A	Fr. B	Fr. C
脱コレステロール化前	357	86	84
脱コレステロール化後	208.6	6.3	6.1

ころ、第10図に示すような溶出パターンが得られ、糖、蛋白質、コレステロールのピークが一致した。このフラクションをFr. A'とした。このフラクションがコレステロール吸着活性が最も高かった。

(4) SDS-PAGE電気泳動

7.5% SDSを含むミニスラブゲルを用いてSDS-PAGE電気泳動をFr. A、Fr. B、Fr. C及びFr. A'について行った。

すなわち、各フラクションの乾燥重量1mgを水40μlに溶解し、1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)10μlを加え、100℃で3分間加熱後、その10μlを0.1% SDSを含むトリス-グリシン緩衝液を用いて10mA、2時間30分泳動させた。糖の検出はPAS染色で、蛋白質の検出はクマシーブリリアントブルーR 250染色で行った。その結果、Fr. Aは糖が泳動距離に応じてゲルの上、中及び下部の3箇所認められ、また、最下部の糖と同位置に蛋白質が存在した。Fr. BはFr. Aと同様の泳動像を

示したが、各スポット共全体に薄くテリングしているのが認められた。Fr. Cは下部1ヶ所にのみ糖が認められ、また、同位置に蛋白質も存在していた。

一方、Fr. A^{*}は、ゲル上部に1ヶ所、濃い糖のスポットが検出され、その位置には蛋白質が認められなかった。

このことから、最もコレステロール吸着活性の高いFr. A^{*}は低分子の蛋白質が混在している状態であるといえる。このことは、Fr. AまたはFr. A^{*}をプロテアーゼ処理してもコレステロール吸着に何ら影響を及ぼさないことから確認できた。

Fr. A及びFr. A^{*}は、セチルトリメチルアンモニウムブロマイドの添加によって沈澱を生じること、また、カルバゾール硫酸法によって特異的な呈色が認められることからウロン酸の存在が確認され、また、ガスクロマトグラフィーによる分析の結果、中性糖はガラクトースであることが認

められたことから、本活性画分はガラクトースとウロン酸から成る酸性多糖類であるといえる。

実施例4

酸性多糖類のコレステロール及び酸化コレステロール吸着能；

実施例1に準じ、50mMリン酸緩衝液(pH 7.0)5mlにコレステロールを5mg、精製酸性多糖類を1mg添加、対照として各種多糖類を10mgずつ添加し、37℃で一晩振盪した後、多糖類に吸着したコレステロール量を測定した。

第11図にキャンディグ・テヌス SBT 5287株から得られた酸性多糖類のコレステロール吸着活性を、その他の多糖類のそれと比較した結果を示す。この結果から酸性多糖類のコレステロール吸着活性が、(1)アミロース、 β -シクロデキストリン等、(2)アラビヤゴム等、(3)キチン等のそれに比べて著しく高いことが判明した。

実施例5

吸着剤としての用途；

実施例2及び3による酸性多糖類10mgと乳糖500mgを加えて錠剤とした。本錠剤を毎日経口的に飲用すると健康上有用である。

本発明において、これを吸着剤として利用するには、培養上清は加熱殺菌し、そのまま、または濃縮し、あるいは凍結乾燥して、また酸性多糖類はそのまま使用できる。

これらを錠剤にしたり、飲料、肉製品、パン、麺類等の飲食品に添加して使用する。使用量は1日成人当り10~100mgが適当である。またこれらの物質は毒性はほとんどない。

発明の効果

本発明によるキャンディグ・ケフィール、キャンディグ・テヌスはコレステロール及び酸化コレステロールを吸着する性質のある酸性多糖類を高収率に生産する。そして得られる培養上清、酸性多糖類は、コレステロール及び酸化コレステロールを吸着するので、コレステロール等を含む食品等に添加してコレステロール等を除去することも

できるし、あるいはこれを飲料、カプセル剤等に加工して飲用し、健康を維持することもできる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、キャンディグ・テヌスの培養上清の容量とコレステロール吸着量との関係を、第2図は、培養上清の容量と脱変異原作用との関係を、第3図は、酸性多糖類のカラムクロマトグラフによる溶出状態を、第4図はそのセルローズ・アセテート電気泳動図を、第5図は¹³C NMRを、第6図はそのガスクロマトグラフをそれぞれ示す。

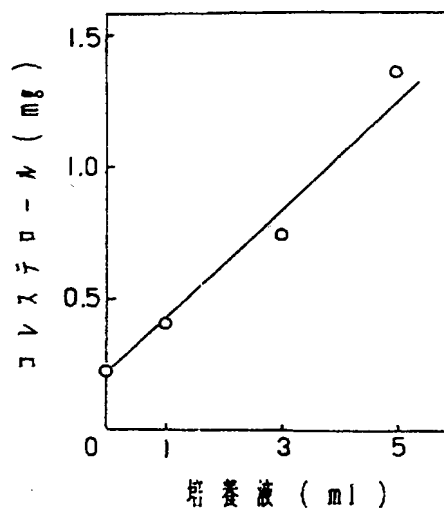
第7図は、キャンディグ・ケフィールの培養液にコレステロールを加えて生ずる沈澱画分を水に溶解後 Bio-gel-P-150カラムクロマトグラフィーにかけた場合の溶出パターンを、第8図は、この画分を脱コレステロール化した後の溶出パターンを示す。図中、○-○は糖を、×-×はコレステロールをそれぞれ示す。

第9図は、上記 Bio-gel-P-150の Fr. Aを再度 Bio-gel-P-150カラムクロマトグラフィーにかけ

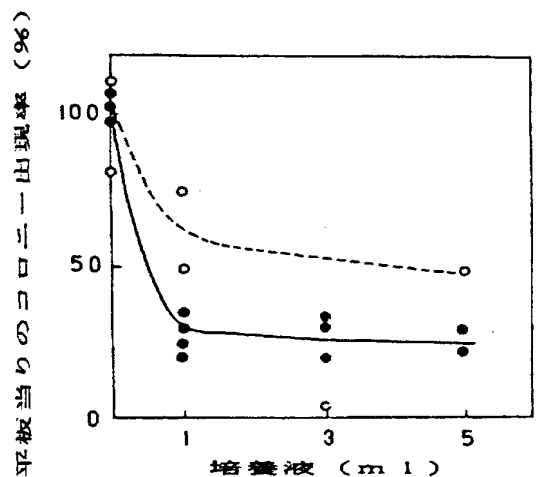
た溶出パターンを、第10図はその Fr. A' を再度 Bio-gel-P-150カラムクロマトグラフィーにかけた溶出パターンをそれぞれ示す。図中、○-○、×-×は第8図及び第9図と同様であり、△-△は蛋白質を、また●-●は280nmにおける吸光度をそれぞれ示す。

第11図は、多糖類(10mg/5ml)のコレステロール吸着活性を示す。図において

- (1) はアミロース、セルロース、 β -サイクロデキストリン、デキストラン、イヌリン、コンニャクマンナン、プルラン、可溶性澱粉のそれを、
- (2) はアラビアゴム、カラギーナン、グリコーゲン、ローカストビーンガム、ペクチン、キサンタンガムのそれを、
- (3) はキチン、ヒアルロン酸ナトリウム塩、アルギン酸ナトリウムのそれを、
- (4) はキャンディダ・テヌス SBT 5287 の酸性多糖類のそれをそれぞれを示す。

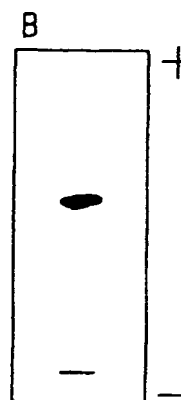


第1図

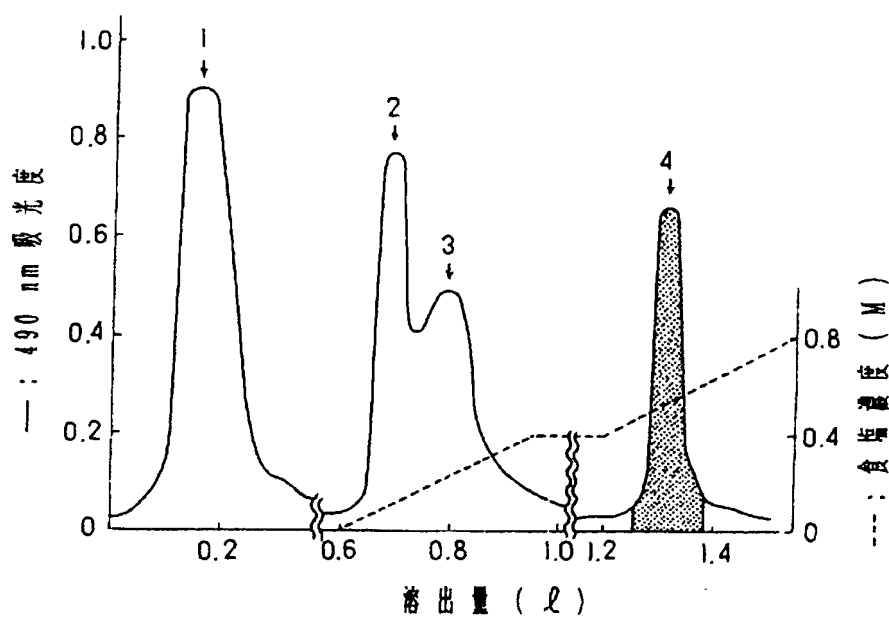


- コレスタン-3 β 、5 α 、6 β -トリオール
- 25-ハイドロキシコレステロール

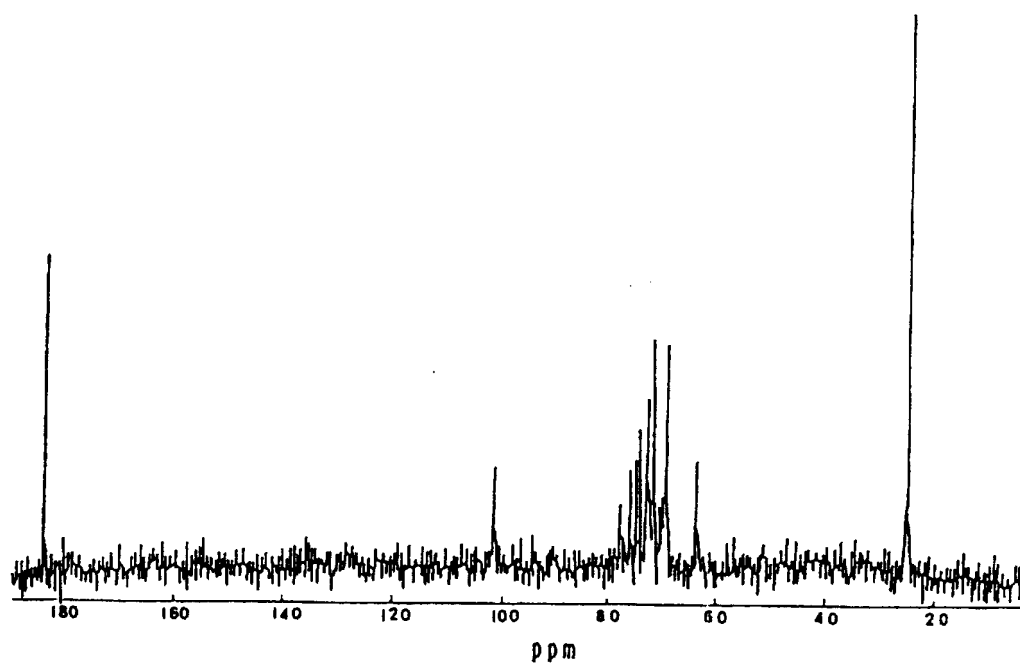
第2図



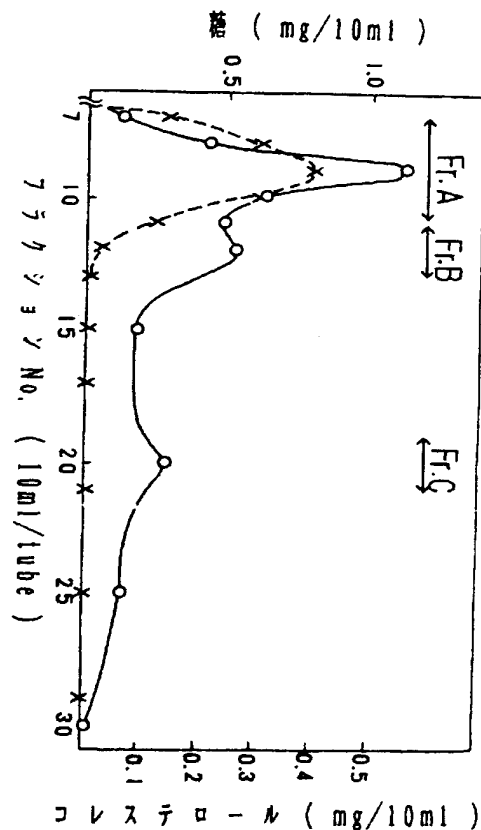
第4図



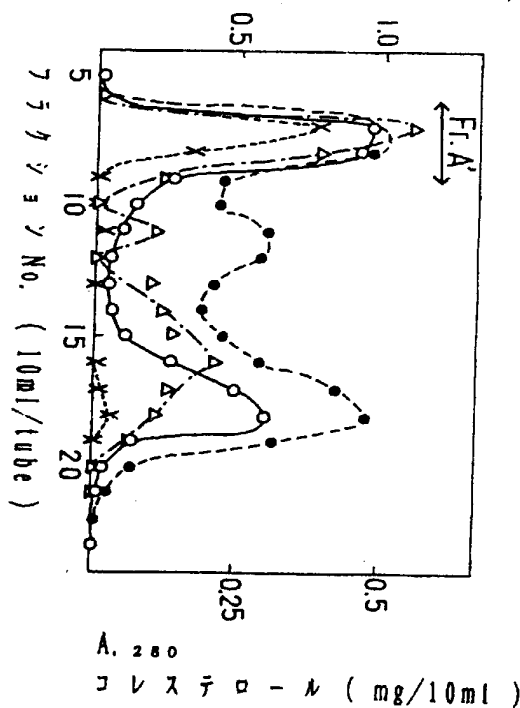
第 3 図



第 5 図



糖, タンパク質 (mg/10ml)



A. 280

第 7 図

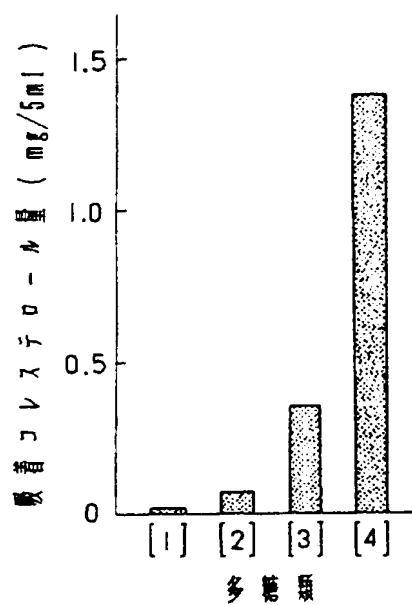
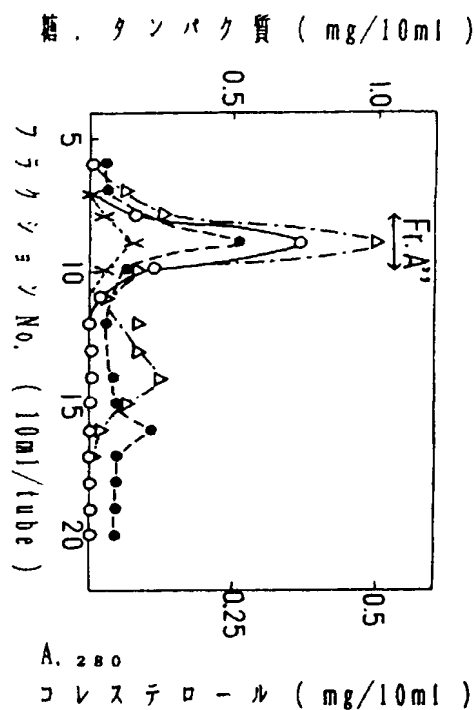
第 8 図



第 9 図

第 8 図

第10図



第11図

第1頁の続き

⑥Int.Cl.³

識別記号

庁内整理番号

// A 23 L 1/30
 (C 12 N 1/16
 C 12 R 1:72)
 (C 12 P 19/04
 C 12 R 1:72)

Z 8114-4B